

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau



2

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : A61K 38/00, 38/04, 38/08, C12Q 1/68, C12N 5/00, 5/06		A1	(11) International Publication Number: WO 00/15242
			(43) International Publication Date: 23 March 2000 (23.03.00)
(21) International Application Number: PCT/US99/20971		(81) Designated States: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) International Filing Date: 10 September 1999 (10.09.99)		Published <i>With international search report.</i> <i>Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i>	
(30) Priority Data: 60/099,906 11 September 1998 (11.09.98) US			
(71) Applicant (for all designated States except US): CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY [US/US]; 1200 E. California Boulevard, MS 16-30, Pasadena, CA 91125 (US).			
(72) Inventor; and (75) Inventor/Applicant (for US only): DERVAN, Peter, B. [US/US]; California Institute of Technology, 1200 E. California Boulevard, MS 16-30, Pasadena, CA 91125 (US).			
(74) Agents: CHAMBERS, Daniel, M. et al.; Lyon & Lyon LLP, Suite 4700, 633 West Fifth Street, Los Angeles, CA 90071-2066 (US).			
(54) Title: REGULATION OF HER2/neu ONCOGENE EXPRESSION BY SYNTHETIC POLYAMIDES			
(57) Abstract <p>Methods and compositions comprising polyamides capable of binding the minor groove of double-stranded DNA are described for the inhibition or reduction or gene transcription and expression. The polyamides comprise at least four complementary pairs of aromatic carboxamide residues which are selected to specifically contact and/or bind to the nucleotide sequence of a double-stranded DNA target in the promoter region of the target gene. The methods, compositions, and polyamides are disclosed for the inhibition of oncogene transcription and expression as well as the treatment of cancer.</p>			

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)特許出願公表番号
特表2002-524525
(P2002-524525A)

(43)公表日 平成14年8月6日(2002.8.6)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	FI	テマコード [*] (参考)
A 6 1 K 38/00		A 6 1 P 35/00	2 G 0 4 5
A 6 1 P 35/00		43/00	1 0 5 4 B 0 2 4
43/00	1 0 5	G 0 1 N 33/15	4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/09	Z N A	33/50	Z 4 C 0 8 4
G 0 1 N 33/15		33/566	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000-569826(P2000-569826)
(86)(22)出願日 平成11年9月10日(1999.9.10)
(85)翻訳文提出日 平成13年3月9日(2001.3.9)
(86)国際出願番号 PCT/US99/20971
(87)国際公開番号 WO00/15242
(87)国際公開日 平成12年3月23日(2000.3.23)
(31)優先権主張番号 60/099,906
(32)優先日 平成10年9月11日(1998.9.11)
(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 カリフォルニア・インスティテュート・オブ・テクノロジー
CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY
アメリカ合衆国91125カリフォルニア州パサディナ、イースト・カリフォルニア・パークロード1200番
(74)代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 合成ポリアミドによる発癌遺伝子HER/2neu発現の制御

(57)【要約】

遺伝子転写および発現を抑制または減少させる、二本鎖DNAの小溝へ結合することのできるポリアミドを含有する方法および組成物を開示する。ポリアミドは少なくとも4つの芳香族カルボキサミド残基の相補対を有しており、これらはプロモーター内の二本鎖DNA標的核酸配列へ特異的に接触および／または結合するように選ばれる。開示した方法、組成物およびポリアミドは、癌遺伝子の転写および発現の抑制ならびに癌の治療に用いられる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 癌遺伝子の発現または過剰発現に係わる疾患を有する対象の治療に有用な組成物であって、医薬上許容される賦形剤、および転写抑制量の少なくとも1のポリアミドを含有する組成物、該ポリアミドは

少なくとも4相補対の芳香族カルボキサミド残基、該カルボキサミドの相補対はdsDNA標的のヌクレオチド配列に対応するよう選択される；

グリシン、 β -アラニン、 γ -アミノ酪酸および5-アミノ吉草酸からなる群から選択される少なくとも2の脂肪族アミノ酸残基；および
少なくとも1の末端アルキルアミノ残基
を含有する。

【請求項2】 対象がヒト患者である、請求項1記載の組成物。

【請求項3】 癌遺伝子が細胞性もしくは内因性癌遺伝子である、請求項1記載の組成物。

【請求項4】 該癌遺伝子の該転写抑制が、ESX、ETSおよびTBPからなる群から選択されるタンパク質因子のdsDNAへの結合を調節することによってなされる、請求項1記載の組成物。

【請求項5】 疾患が乳癌である、請求項1記載の組成物。

【請求項6】 該ポリアミドの標的dsDNA配列に対する結合親和性が少なくとも 10^9 M^{-1} であり、選択性が少なくとも約2である、請求項1記載の組成物。

【請求項7】 芳香族カルボキサミド残基が標的dsDNAのヌクレオチド配列に対応するよう選択され、該対応が

ヌクレオチド対G/Cに対応してIm/Py、

ヌクレオチド対C/Gに対応してPy/Im、

ヌクレオチド対A/Tに対応してPy/Py、

ヌクレオチド対T/Aに対応してPy/Py、

ヌクレオチド対T/Aに対応してHp/Py、

ヌクレオチド対A/Tに対応してPy/Hp

(ただし、ImはN-メチルイミダゾールであり、PyはN-メチルピロールで

あり、H p は3-ヒドロキシN-メチルピロールである)からなる群から選択される請求項1記載の組成物。

【請求項8】 少なくとも1の脂肪族アミノ酸残基が β -アラニンである、請求項1記載の組成物。

【請求項9】 該ポリアミドが2つの β -アラニン残基を有しており、これがヌクレオチド対A/TまたはT/Aに対応する相補対残基を形成している、請求項1記載の組成物。

【請求項10】 末端アルキルアミノ残基がN,N-ジメチルアミノプロピル残基である、請求項1記載の組成物。

【請求項11】 カルボキサミド対の少なくとも1つのP y が β -アラニンで置換されている、請求項1記載の組成物。

【請求項12】 ポリアミドがH e r 2-1およびR P R 70からなる群から選択される、請求項1記載の組成物。

【請求項13】 請求項1記載の組成物を投与することを含む、癌遺伝子の発現または過剰発現に係わる疾患を有する対象を処置する方法。

【請求項14】 対象がヒト患者である、請求項13記載の方法。

【請求項15】 癌遺伝子が細胞性もしくは内因性のものである、請求項13記載の方法。

【請求項16】 癌遺伝子の転写の抑制が、E S X、E T SおよびT B Pからなる群から選択されるタンパク質因子のd s DNAへの結合を調節することによってなされる、請求項13記載の方法。

【請求項17】 疾患が乳癌である、請求項13記載の方法。

【請求項18】 該ポリアミドの標的とするd s DNA配列に対する結合親和性が少なくとも 10^9 M^{-1} であり、選択性が少なくとも約2である、請求項13記載の方法。

【請求項19】 芳香族カルボキサミド残基の相補対が、標的d s DNAのヌクレオチド配列に対応するよう選択され、該選択が、ヌクレオチド対G/Cに対応してI m/P y、
ヌクレオチド対C/Gに対応してP y/I m、

ヌクレオチド対A／Tに対応してP_y／P_y、

ヌクレオチド対T／Aに対応してP_y／P_y、

ヌクレオチド対T／Aに対応してH_p／P_y、

ヌクレオチド対A／Tに対応してP_y／H_p

(ただし、I_mはN-メチルイミダゾールであり、P_yはN-メチルピロールであり、H_pは3-ヒドロキシN-メチルピロールである)からなる群から選択される請求項13記載の方法。

【請求項20】 脂肪族アミノ酸残基がβ-アラニンである、請求項13記載の方法。

【請求項21】 該ポリアミドが二つのβ-アラニン残基を有しており、これがヌクレオチド対A／TまたはT／Aに対応する相補対を形成する、請求項13記載の方法。

【請求項22】 末端アルキルアミノ残基がN,N-ジメチルアミノプロピル残基である、請求項13記載の方法。

【請求項23】 カルボキサミド対の少なくとも1つのP_yがβ-アラニンで置換されている、請求項13記載の方法。

【請求項24】 ポリアミドがH_{er}2-1およびR_{PR}70からなる群から選択される、請求項13記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

国立衛生研究所により与えられたGM26453、27681およびA12981号許可に基づき、米国政府は本発明について一定の権利を有する。

関連出願

本出願は米国仮出願第60/099,906号(1998年9月11日出願)に基づく優先権を主張する。本仮出願は引用することにより本願の一部をなす。

【0002】**技術分野**

本発明は、全体的にはDNAに結合するポリアミドを用いて遺伝子の発現を調節もしくは制御するための方法および組成物に関する。本発明の方法および組成物は、遺伝子の発現もしくは過剰発現を、ポリアミドと二本鎖DNA(dsDNA)の小溝(minor groove)との相互作用により抑制もしくは減少させる結果に導く。この方法および組成物に用いるポリアミドは、減少もしくは抑制しようとする遺伝子のプロモーター領域内の予め定められた核酸配列へ結合する。発現もしくは好ましくないレベルに過剰発現している、標的とする癌遺伝子を抑制もしくは減少させることが、本発明の一つの実施態様である。特に、本発明は標的内因性細胞性癌遺伝子の発現もしくは過剰発現を減少させることを目的とする。

【0003】**発明の背景**

チロシンキナーゼ膜成長因子受容体HER2/neuは、p185^{HER2}としても知られており、同じ名前の細胞性癌遺伝子によってコードされる。この受容体はヒト乳癌の20乃至30%において増幅が認められるが婦人科腺癌、例えば卵巣癌、子宮内膜癌、卵管癌、および子宮頸癌を含む他の癌ではそうではない。Baert, J. L. ら、Int. J. Cancer 70, 590-597(1997); Benz, C. ら、Oncogene 15, 1513-1525(1997); Chang, C. H. ら、Oncogene 14, 1617-1622(1997); Scott, G. K. ら、J. Biol. Chem. 269, 19848-19858(1994); Pasleau, F. ら、Oncogene 8, 849-854(1993); Tal, M. ら、Molecular and Cellular Biology 7, 2597-2601(1987); (Cirisano, F. D., & Karlan, B. Y., J. Soc. Gynecol. Investig. 3 99-105(1996))参照。

【0004】

neu癌遺伝子の遺伝子は、げっ歯類の化学(エチルニトロソウレア)誘導性腫瘍において最初に見出された。次いで、ヒトのこれに対応する遺伝子c-erbB-2またはHer-2/neuが、タンパク質チロシンキナーゼ活性を有する膜貫通性の185kDaのタンパク質であるEGF受容体とホモログスであることが見出された。HER2/neuの過剰発現がある場合はまた、腫瘍が転移性となる可能性が高く、そのため、患者の予後が良くない。Her-2/neu癌遺伝子の変異、増幅および過剰発現が、乳癌の進行、早期転移および予後不良を伴うとの報告がある。Her-2/neu遺伝子の増幅はリンパ節転移に直接関係している。さらに動物モデルにおいて、転移を活性化して腫瘍の進行を早めると報告されている。というわけで、HER2/neuタンパク質は、細胞の運動性に関与しており、従って、転移にかかわっていると考えられる。即ち、HER2/neu遺伝子の発現をDNAレベルで直接妨害することによって抑制することは、転移性疾患の強力な治療アプローチとなりうる。

【0005】

ESX、AP-2およびTATA結合性タンパク質(TBP)のごときいくつかの転写因子は、HER2/neu増殖因子受容体の遺伝子の発現制御において重要な役割を果たしている。Baert, J.-L.ら、前出; Benz, C.ら、前出; Chang C. H.ら、前出; Bosher, J.M.ら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92, 744-747(1995)参照。これらの転写因子はHER2/neuプロモーター内の部位へ結合してp185HER2の発現を活性化させる。HER2/neuプロモーターのヌクレオチド配列および概略図を図1に示した。

【0006】

TBPは遍在性転写因子であり、ほとんどのタンパク質をコードする遺伝子の活性化に関与している。TBPはDNA結合性タンパク質であり、DNAの小溝と相互作用する。ESX、AP-2およびTBP以外の別の転写因子結合部位となり得る部位がHER2/neuプロモーター内にあることに注目したい。

【0007】

新しい治療手段の開発を目的として、生細胞の遺伝子発現を妨害する方法を考

案するための様々な努力がこれまで、本技術分野においてなされてきた。これらの試みとしては、メッセンジャーRNAをタンパク質へ翻訳する際に、アンチセンスオリゴヌクレオチド(天然またはペプチド核酸ベース)を細胞内へ導入することによって、またはリボザイム媒介性特異的RNAの破壊によって妨害する方法がある。遺伝子転写の直接抑制を目的とするいくつかの試みもまたなされている。これらの試みとしては、三重らせん生成性オリゴヌクレオチド、予め定めた配列を認識するZnフィンガーペプチドの創出または選択、およびDNA結合性カリシェミシン(calicheamicin)オリゴサッカライドなどが挙げられる。

【0008】

遺伝子発現への干渉による治療アプローチを成功させるためには、治療用の剤はいくつかの基準を満たしていなくてはならない。第1に、剤は一般的な細胞毒性を有してはならない；第2に、該剤は細胞透過性でなくてはならない、DNA結合性の剤である場合には、化合物は核へと運ばれ、そこでクロマチンに関して標的配列と高い親和性および特異性を持って結合しなくてはならない；第3に、剤のそのDNA標的配列への結合は、遺伝子転写を妨害しなければならない。上述の各試みには、それぞれ弱点がある。例えば、三重らせん形成性オリゴヌクレオチドは配列選択性を賦与することが可能であり、インビトロで転写を有効に抑制することができるが、かかる分子は細胞透過性が低く、細胞透過性を高めた細胞を用いなくては有効な遺伝子抑制を誘導できない。同様に、Znフィンガーペプチドは細胞内へ直接入ることができないことから、これを遺伝子治療に使用するには、適当なウイルス性もしくは非ウイルス性発現ベクターを用いて導入する必要がある。これに対して、カリシェミシンオリゴサッカライドは十分な疎水性を有しており、細胞膜を容易に透過するが、この分子は非常に制限された配列特異性(4bp)を有し、非常に低い親和性(タンパク質-DNA相互作用の抑制には100 μ M以上必要)しか示さない。従って、より高いDNA配列特異性および親和性を有する新規な細胞透過性分子が、ヒト遺伝子治療を実現するために必要とされている。

【0009】

他の試みにおいては、細胞透過性の小分子であって特定のDNA配列を標的と

するものが利用されている。かかる分子は、遺伝子発現の制御に有用であろう。DNA二本らせんの特定の配列を認識する小さな合成DNA結合性リガンドのデザインは、長い間目標とされてきた化学のゴールである。二重らせんDNAの主溝を認識するオリゴデオキシヌクレオチドは、三重らせんの生成を介して高い親和性と特異性をもって広い範囲の配列へ結合する。オリゴヌクレオチド及びその類縁体が遺伝子発現を抑制することが示されているが、三重らせんアプローチはプリントラックに限定され、また細胞内への取りこみが少ないという不利益がある。

【0010】

他の小さな分子についても、DNA結合リガンドとして興味をもたれている。Wadeらは5'-(A, T)G(A, T)C(A, T)-3'配列において二量体のサイドバイーサイドモチーフによりDNAの小溝へ結合するペプチドのデザインを報告している(J. Am. Chem. Soc. 114, 8783-8794(1992))。Mrksichらは、DNAの小溝における配列特異的認識のための逆平行サイドバイーサイドモチーフとしてデザインした1-メチルイミダゾール-2-カルボキシアデノトロプシンを報告した(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 7586-7590(1992))。Pelton, J. G. & Wemmer, D. E. は2-1 ディスタマイシンA-d(CGCAAA TTTGGC)複合体の二元NMRによる構造解析を報告している(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 5723-5727(1989))。

【0011】

Dervanらは合成ピロールイミダゾールポリアミド類がDNAと、多くの配列特異的転写因子をしのぐほどの優れた特異性と非常に強い親和性を持って結合することを報告した(Traugerら、Nature 382, 559-561(1996))。彼らは更に、ナノモルレベル以下のDNAを認識できるリガンドをデザインしたと報告した。DNAの認識は、小溝中におけるイミダゾールピロールまたはピロールピロール対のサイドバイーサイドアミノ酸対に依存する。White S. ら(1996)は、DNAの小溝内ピロールイミダゾールポリアミド認識のA・T/T・A縮重の作用を報告した(Biochemistry 35, 6147-6152(1996))。Whiteら(1997)は、ピロールイミダゾールポリアミドによる、DNAの小溝内認識の対形成ルールを報告し(Che

m. & Biol. 4, 569-578)、小溝内におけるポリアミド結合には、5' - 3' N - C 方向が好ましいことを示した。従って、ポリアミド分子は小溝中のタンパク質-DNA相互作用の抑制剤として作用する可能性が予測される。

【0012】

N-メチルピロールおよびN-メチルイミダゾール(Im)アミノ酸から誘導される小溝結合性ポリアミドの対形成ルールを確立することは、別に言えば配列の特異性を獲得することである。Im/Py対はG・CとC・Gを区別し、これら両方をA・TまたはT・A塩基対と区別するが、Py/Imが標的とするのはC-G塩基対である。Py/Py対はA・TをG・Cから区別できるが、A・TとT・Aの区別はしない。このような配列特異的DNAリガンドへの合理的なアプローチは直接NMR構造解析に支持され(Geierstanger, Science 266, 646-650(1994))また最近6塩基対配列を標的にして、これに見かけ解離定数0.03 nMで結合する8リングヘアピンポリアミドの合成に成功した(Traugerら、既出)。さらに、1のアミノ酸残基のみで相違する二種類の8リングピロルーイミダゾールポリアミドが、1の塩基対のみで相違するそれぞれ別の6塩基対標的部位に結合する。1の窒素原子を1個の-CHと置換することによって、特異性および親和性を2オーダー変えることができる。

【0013】

6塩基対配列はヒトゲノムにおいては非常に重複している(アトランダムに出現するとして、4キロベースにつき1部位、またはヒトゲノム内で500000部位)ことから、より長い配列を認識するポリアミドの合成が行われてきた。例えば、12リングのダブルヘアピンポリアミドは12bp部位を標的とするようデザインされ、ナノモル単位の親和性にて結合する。かかる配列は、アトランダムだとして1600万塩基対毎に1部位もしくはヒトゲノム中125部位にしかない。従って、この分子はインビボ遺伝子転写の特異的抑制剤として有力であり、上述のような条件が合致すればヒトの治療薬としても有力な候補である。

【0014】

発明の概要

本発明は、遺伝子の転写を減少させることによって遺伝子発現もしくは過剰発

現を調節もしくは制御する方法および組成物に関する。好ましくは、本発明により標的遺伝子の転写が特異的に減少される。かかる減少は、標的遺伝子のプロモーター領域内の二本鎖DNA(dsDNA)の小溝と結合もしくは相互作用するポリアミドを適用する結果として生じる。好ましくは、転写を抑制もしくは減少すべき遺伝子のプロモーター領域内の核酸配列の予め定めた標的に対して、この結合もしくは相互作用が生じる。

【0015】

本発明は、細胞透過性であり、遺伝子の転写を抑制することのできる配列特異的DNA結合性小分子を用いて遺伝子の発現および過剰発現を減少させる。該分子を適当に投与すれば、内因性癌遺伝子の過剰発現が抑制されることから、癌を含む様々な疾患の全く新たな治療方法が提供される。本発明の小分子は標的遺伝子のプロモーター領域内の核酸配列へ結合もしくはこれと相互作用するポリアミドである。好ましくは、この配列は1または複数の転写因子に認識される配列であるか、その近位にある配列である。

【0016】

好ましくはポリアミドは、遺伝子の転写および発現を調節するプロモーター領域内の二重鎖DNA小溝へ結合する。好ましくは、遺伝子の転写はdsDNAへのタンパク質転写因子の結合の調節によって抑制される。好ましい態様において、転写因子はESX、ETSおよびTBPである。

【0017】

HIV-1プロモータの転写活性の抑制に関する従来の研究により、ポリアミドがTBPならびにEstファミリー転写因子の結合をブロックできることが明らかにされている(PCT公開出願PCT/US98/02444、現在WO98/35072(明細書は引用により本発明の一部とする))。原則として、いずれの種類の転写因子もdsDNAの小溝と接するかまたは結合するポリアミドにより抑制することができる。小溝と接するタンパク質のDNA複合体化は直接的立体障害、反発、排除または別法としてアロステリック効果により抑制される。たとえば、主溝結合タンパク質の結合は、ポリアミドにより誘発されるDNA立体配座の変化により抑制することができる。もちろん、抑制は他の方法、例えば

DNA開裂剤の所望の部位を標的とするポリアミドとの接合、またはDNAの化学的修飾によっても達成することができる。

【0018】

本発明の好ましい態様のひとつにおいて、癌遺伝子の発現または過剰発現が標的とされる。好ましくは、癌遺伝子は内因性細胞性癌遺伝子であり、癌、特に乳癌に大きく関与する遺伝子である。本発明の癌遺伝子の1の標的は、HER2/neu遺伝子であり、これはHER-2/neuプロモーター領域内の標的配列と結合するポリアミドを使用することによりダウンレギュレーションまたは抑制することができる。好ましくは、ポリアミドにより標的とされる配列は、癌遺伝子プロモーター内の転写因子結合部位であるかまたはその近位にある部位である。ポリアミドと標的配列間の相互作用または結合により、HER2/neu遺伝子の転写を抑制することができる。癌遺伝子発現の抑制の程度は強く、過剰発現の抑制も包含する。本発明にはさらに、乳癌を含む様々な腫瘍や癌の治療のためにポリアミドを投与することも包含する。

【0019】

適当なポリアミドはdsDNA標的配列において少なくとも 10^{-9}M^{-1} の結合親和性および少なくとも約2の選択性を有するものである。選択性は、同定されたdsDNA標的配列に対する結合親和性の、1塩基対ミスマッチdsDNA配列に対する結合親和性の比と定義される。好ましい態様において、少なくとも90%の1塩基ミスマッチ配列に対する選択性は約10を越える。

【0020】

本発明の態様において、医薬上許容される賦形剤と、少なくとも1の本発明のポリアミドの少なくとも1の転写抑制量を含む組成物が提供される。各ポリアミドは少なくとも4の芳香族カルボキサミド残基の相補対を含み、該対はdsDNAの同定されたヌクレオチド配列に対応するように選択される。好ましくは、ポリアミドは更に、グリシン、 β -アラニン、 γ -アミノ酪酸、R-2,4-ジアミノ酪酸、および5-アミノ吉草酸からなる群から選択される少なくとも2の脂族アミノ酸残基、および少なくとも1つの末端アルキルアミノ残基を含み、ポリアミドは標的dsDNA配列に対して少なくとも 10^{-9}M^{-1} の結合親和性と

少なくとも約2の選択性を有する。ここで選択性は、同定された標的dsDNA配列に対する結合親和性と、1の塩基対ミスマッチdsDNA配列に対する結合親和性との比と定義される。

【0021】

本発明は更に細胞性癌遺伝子の異常な発現に関連する状態を有する対象を治療するのに適した方法を提供する。対象は好ましくはヒト患者であり、より詳細には、乳癌または異常なHer2/neu癌遺伝子発現が関与する他の疾患または症状に苦しんでいる患者である。

【0022】

詳細な説明

本発明は遺伝子の転写を減少することにより、遺伝子発現もしくは過剰発現を調節もしくは制御する方法および組成物に関する。本発明の方法および組成物は好ましくは、癌遺伝子の転写、特に癌、特にヒトの癌、それも乳癌に関与する癌遺伝子の転写を抑制する子とを目的とするものである。

【0023】

遺伝子転写の低減は、ポリアミドと標的癌遺伝子のプロモーター領域内のdsDNAの小溝間との結合または他の相互作用の結果として得られる。好ましくは、ポリアミドはプロモーター領域内の特定の標的核酸配列と結合または相互作用して、癌遺伝子転写を抑制するかまたはダウンレギュレートする。好ましくは、該配列は、1またはそれ以上の転写因子により認識されるかまたは認識されるものの近位にある配列である。

【0024】

本発明のポリアミドは好ましくは細胞透過性であり、インビボおよびインビトロもしくはセルフリーの系にて遺伝子転写を抑制することができる。かかるポリアミドは、内因性癌遺伝子の発現もしくは過剰発現を抑制すべく、癌を含む様々な疾患の治療に適用し得る。

【0025】

好ましい態様において、ポリアミドは、標的遺伝子の転写および発現を制御するプロモーター領域内の二本鎖DNAの小溝と結合する。好ましい標的遺伝子は

、癌形成または進行に関与する内因性癌遺伝子である。好ましくは、遺伝子の転写はタンパク質、例えば転写因子の、ポリアミドが結合または相互作用する同じプロモーター領域との結合を制御することにより抑制される。特に好ましい態様において、転写因子は1またはそれ以上の以下にあげるものである：ESX；ETS、およびTBP。

【0026】

HIV-1プロモーターでの転写活性が抑制されることは、ポリアミドがTBPならびにEtsファミリー転写因子の結合をブロックできることを示す。WO 98/35702参照。ここにはポリアミドの合成についても開示されている。本発明には、TBPおよびEts転写因子の活性を抑制もしくは制御するポリアミドの使用も包含する。本発明の方法は、dsDNAの小溝と接するかまたは結合する1またはそれ以上のポリアミドを使用することにより転写因子活性に影響を及ぼす。このような接触または結合により、直接的反発、アロステリック効果、または他のメカニズム(たとえば、dsDNAの開裂または化学的修飾)により小溝におけるDNA転写因子複合体の形成が抑制され得る。加えて、TBPなどの主溝DNA結合タンパク質の結合は、隣接する小溝との会合によりポリアミドが誘導するDNA構造変化により抑制され得る。

【0027】

本発明の好ましい態様において、癌遺伝子、特に内因性細胞性癌遺伝子の発現または過剰発現が標的とされる。好ましくは、癌遺伝子はヒト乳癌に影響するものであり、その発現または過剰発現が、癌遺伝子プロモーターの領域における小溝と接触するかまたは結合するポリアミドにより抑制される。好ましくは、プロモーター領域の接触または結合部分は、転写因子結合部位であるかまたはこれの近位にある。抑制の程度は、好ましくは高いものであり、より好ましくは遺伝子のコピー数が増加する癌遺伝子の過剰発現さえも抑制するのに十分、高いものである。

【0028】

本発明の癌遺伝子標的の一例はHER-2/neu遺伝子であり、これはHER-2/neuプロモーター領域内の標的配列と結合するポリアミドを使用する

ことによりダウンレギュレートできるかまたは抑制できる。好ましくは、この配列はHER-2/neuプロモーター内の転写因子結合部位であるかまたはこれの近位にある。転写因子としては、TBP、ESX、およびAP-2が挙げられる。ポリアミドと標的配列間の相互作用または結合により、HER-2/neu遺伝子転写が抑制される。

【0029】

好ましい態様において、ポリアミドはヒトHER2/neu乳癌遺伝子プロモーター内に見られるTATAエレメントからすぐ下流部位に結合するようにデザインされる。このポリアミドHer2-1はImPy-β-PyIm-γ-PyPy-β-Dpの構造を有しており、5'-AGAATGA-3' (本配列の5'AはTATAエレメントの3'Aである) に見かけ上の解離定数200 pMにて結合する。Her2-1はTBPの結合および転写に対する有効な抑制剤である。

【0030】

本発明は、遺伝子発現または過剰発現を抑制するための、医薬上許容される賦形剤と転写抑制量の少なくとも1つのポリアミドを含む組成物を包含する。これらの組成物は、乳癌をはじめとする種々の腫瘍または癌の治療にも用いることができる。本発明はさらに遺伝子発現または過剰発現を抑制するためにこのような組成物を適用する方法も提供する。該方法および組成物は好ましくは、細胞癌遺伝子の異常な発現に関連する疾患を有する対象を治療するのに適したものである。本発明が好適に適用される対象はヒト患者、特に癌、特に乳癌に苦しんでいる患者である。

【0031】

本発明のポリアミド

本発明で用いられるポリアミドはN-メチルイミダゾールおよびN-メチルピロールカルボキサミドを含有する。これらのポリアミドは通常、三日月型構造を有し、これが二本鎖DNAの小溝との相互作用および複合体化を可能にする。NMR試験の結果、2つのポリアミドリガンドが逆平行に並んでいるモチーフによって、これらの化合物がDNAに2:1の比で結合できることを確認した(Pelton, J. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 5723-5727(1986); Mrksich ら、Proc. Natl

. Acad. Sci. USA、86、5723-5727(1986); Mrksichら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89、7586-7590(1992); Wade、J. ら、Am. Chem. Soc. 114、8783(1992))。

【0032】

2つのポリアミドの結合親和性を増強する1つの手段は、それらをγ-アミノ酪酸等のターンユニットで共有結合的に連結することである(Mrksichら、J. Am. Chem. Soc. 116、7983(1994)を参照)。このようなポリアミドは、DNA複合体中でヘアピン様のコンフォメーションをとるので、「ヘアピンポリアミド」と称される。上記のヌクレオチド対を認識するカルボキサミド対の機構に従い、ポリアミド中のイミダゾールおよびピロールカルボキサミドの配列によって、リガンドのDNA配列特異性が決定される。いくつかの場合においては、1または数個のピロールカルボキサミドユニットをβ-アラニン部と置き換えて、DNAの湾曲に対してポリアミドの湾曲を調整することが有益である。最近、N-メチルイミダゾールおよびN-メチルピロールカルボキサミドを含有するポリアミドは真核細胞における遺伝子発現を抑制できることが示された(Gottesfeldら、Nature 387、203-204(1997))。

【0033】

新たな芳香族アミノ酸、3-ヒドロキシ-N-メチルピロール(Hp)は向かい合うPyと対になり、これを含有するポリアミドは、DNA配列中のA・Tヌクレオチド対をT・Aヌクレオチド対から識別することが分っている。Hp/Py対中のピロールにおける単独の水素原子のヒドロキシ基との置換は、ポリアミドの親和性および特異性に大規模な影響を与える。HpをPyおよびImとともに芳香族アミノ酸残基の4対の組合せ(Im/Py、Py/Im、Hp/Py、およびPy/Hp)で用いることにより、二本鎖DNAの小溝における4つの全てのワトソン-クリック塩基対を選択的に区別できる。Whiteら、Nature 391、468-471(1998)。

【0034】

本発明は、遺伝子発現または過剰発現を抑制する方法および組成物における、DNAの小溝への結合に関して改良したポリアミドの使用を含む。DNAの小溝内で結合させるポリアミドの製造および使用は本分野で開示されている。本発明

は、3-ヒドロキシ-N-メチルピロールを利用してDNA結合ポリアミドのためのカルボキサミド結合対を与える既存の技術の改良を含む。その改良は、DNAの小溝内でのT・A塩基対への結合のためにポリアミド中にHp/Pyカルボキサミド結合対を包含させること、またはDNAの小溝内でのA・T塩基対への結合のためにポリアミド内にPy/Hpカルボキサミド結合対を包含させることに関する。本発明に用いられるポリアミドは、小溝内のA・T、T・A、C・GおよびG・C塩基対を区別する少なくとも4つのカルボキサミド結合対を有する。該ポリアミドはまた、ヘアピンループを形成するγ-アミノ酪酸その他のターヌユニットを、その各サイドにおける各カルボキサミド対のメンバーとともに有する。

【0035】

本発明はまたPy残基に換えて置かれたβ-アラニンを含むポリアミドも包含する。これは、通常カルボキサミド結合対において特定のヌクレオチド対を一致させるために用いられる。本発明の式においては該β-アラニンをβと称する。該β-アラニンは、カルボキサミド結合対のメンバーとなり、隣接するアミノ酸部のヌクレオチド塩基対への水素結合を最適化する。本発明はさらに非Hp含有結合対についてのβ・β結合対置換も包含する。したがって、Hp/PyおよびPy/Hpに加える結合対は、Py/Py、Im/Py、Py/Im、Im/β、β/Im、Py/β、β/Py、およびβ/βである。

【0036】

該して、本発明のポリアミドは遺伝子（好適には癌遺伝子）の転写抑制に適している。該ポリアミドは芳香族カルボキサミド残基の少なくとも4つの相補対からなり、この対はdsDNA標的のヌクレオチド配列に対応して選択される。これらのポリアミドは、グリシン、β-アラニン、γ-アミノ酪酸、および5-アミノ吉草酸からなる群から選択される少なくとも2つの脂肪族アミノ酸残基ならびに少なくとも1つの末端アルキルアミノ残基を含む。同定されたdsDNA標的のヌクレオチド配列に対応して選択される芳香族カルボキサミド残基の相補対は、ヌクレオチド対G/Cに対応するIm/Py、ヌクレオチド対C/Gに対応するPy/Im、ヌクレオチド対A/Tに対応するPy/Py、ヌクレオチド対

T/Aに対応するPy/Py、およびヌクレオチド対A/Tに対応するPy/Hpからなる群から選択される（ここで、ImはN-メチルイミダゾール、PyはN-メチルピロールおよびHpは3-ヒドロキシ-N-メチルピロールである）。上記の原理の適用により、遺伝子発現または過剰発現の抑制のための、特異的な標的核酸配列に結合または相互作用する特異的なポリアミドのデザインが可能になる。

【0037】

好適なポリアミドは脂肪属アミノ酸残基として少なくとも1つのβ-アラニンを含む。好適な具体例では、末端アルキルアミノ残基はN,N-ジメチルアミノプロピル残基である。適当なポリアミドには、A/TおよびT/Aの群から選択されるヌクレオチド対に対応する相補対残基を形成するよう並ぶ少なくとも2つのβ-アラニン残基。別法として、Im/β、β/Im、Py/βおよびβ/Pyのような脂肪属アミノ酸と芳香族カルボキサミドとの間に、対応する対を形成してもよい。好適なポリアミドでは、ヘアピン分子は、γ-アミノ酪酸等の脂肪属アミノの残基の含有によって形成される。加えて、本発明のいくつかのポリアミドにおいては、カルボキサミド対の少なくとも1つのPyをβ-アラニンによって置き換える。

【0038】

適当なポリアミドは、少なくとも 10^9 M^{-1} のdsDNA標的配列での親和性、および少なくとも約2の選択性を有する。選択性は、同定されたdsDNA標的配列についての結合親和性の、単塩基対ミスマッチdsDNA配列についての結合親和性の比として定義される。好適な具体例では、少なくとも90%の単塩基ミスマッチ配列に対する選択性は、約10より大きい。

【0039】

本発明の組成物において用いられる各ポリアミドは、好適には、dsDNA標的の同定されたヌクレオチド配列に対応して選択される、芳香族カルボキサミド残基の少なくとも4つの相補対を含む。また該ポリアミドは、好適には、グリシン、β-アラニン、γ-アミノ酪酸、R-2,4-ジアミノ酪酸および5-アミノ吉草酸からなる群から選択される少なくとも2つの脂肪属アミノ酸残基な

らびに少なくとも1つの末端アルキルアミノ残基も含有する。また好適には、該ポリアミドは少なくとも 10^9 M^{-1} のdsDNA標的配列での親和性、および少なくとも約2の選択性を有する。選択性は、同定された標的dsDNA配列についての結合親和性の、単塩基対ミスマッチdsDNA配列についての結合親和性に対する比として定義される。

【0040】

ポリアミドHer2-1を、上記のようにHER2/neuプロモーターのTATAボックスに隣接するDNA配列5'-AGGAATGA-3'に結合するようにデザインした。DNアーゼ1フットプリント分析により、このポリアミドが目的の配列に約0.2 nMの解離定数(Kd)で結合することを確認した。ポリアミド70もまたHER2/neu TATAボックスに隣接して結合、部分的に重複する。Her-2/neu TATAエレメントに隣接して重複するDNAを標的とするこれらのポリアミドを、固相法によって合成した。

【0041】

配列組成ImIm-β-PyIm-γ-PyPy-β-PyPy-β-Dp (ここで、Imはイミダゾールを、Pyはピロールを、γはγ-アミノ酪酸を、βはβ-アラニン、およびDpはジメチルアミノプロピルアミドを示す)のポリアミドHer2-Aは、Her-2/neu TATAエレメントの5'境界の配列5'-AGGAAGT-3'に結合する。一方、配列組成ImPy-β-PyIm-γ-PyPy-β-PyPy-β-DpのポリアミドHer2-1は、上記TATAエレメントの3'境界の配列5'-AGGAATGA-3'に結合する(図1参照)。

【0042】

また配列組成ImIm-β-ImIm-γ-PyPy-β-PyPy-β-Dp (HIV-1と称する)のミスマッチポリアミドも本試験に用いた。配列組成ImPyPyPy-γ-PyPyPyPy-β-Dpのポリアミド70はTATAボックスと重複する5'-AGTATA-3'に結合する。一方、配列組成ImPyImPy-γ-PyPyPyPy-β-Dpのポリアミド86は、ポリアミド70から1原子置換されているミスマッチポリアミドである。

【0043】

図1は、Her-2/neuプロモーター領域の配列および数個の転写因子の結合部位を示す。TBP結合部位に隣接する下流に結合するヘヤピンポリアミド ImPy-β-PyIm-γ-PyPy-β-PyPy-β-Dp を合成した (図2B、左)。

【0044】

HER2/neu 遺伝子含有プラスミド (Ebbinghausら、「三量体形成がインビトロのHER-2/neu転写を抑制する (Triplex formation inhibits HER-2/neu transcription in vitro.)」から単離した ^{32}P -末端標識制限断片において行った定量的DNアーゼIフットプリント試験 (図2A) により、このポリアミド (Her2-1) がその標的配列に $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ の平衡会合定数で結合することが分った。ミスマッチポリアミド ImPy-β-PyIm-γ-PyPyPyPyPyPy-β-Dp (ポリアミド70) は同配列に $2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ の平衡会合定数で結合した (図2B、右)。フットプリント試験により、このポリアミドはまたESX結合部位に隣接する 5'-AGGAAGT-3' 単塩基対ミスマッチ配列にも同等の親和性で結合する。

【0045】

これらのポリアミドの各々についてのTATAボックス領域および結合モデルを図3に示す。この図において、ポリアミドを2本のDNA鎖の間の各々の結合部位に図示する。黒丸と白丸は各々イミダゾール (Im) およびピロール (Py) 環を示す; 曲線はγ-アミノ酪酸 (γ) を示す; 菱形はβ-アラニンを示す; およびDpはジメチルアミノプロピルアミドを示す。これらのポリアミドの各々についての見かけの結合親和性を定量的DNアーゼIフットプリント滴定によって測定した。ポリアミドHer2-Aはその一致部位に $< 10^8 \text{ M}^{-1}$ の K_a で結合するが、ポリアミドHer2-1は $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ の K_a で結合する。標的部位についてのより高い親和性のHer2-1を考えると、下記の例のほとんどは、この化合物を用いた。ポリアミド70についての結合定数は既に報告されており (Traugerら、Nature 382, 559-561, 1996におけるポリアミド2)、 $3.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ である。ミスマッチポリアミドは極めて低い親和性で結合する。

【0046】

医薬および治療組成物

本発明のポリアミドおよびその医薬上許容される塩を製剤して、医薬または治療組成物または製剤にしてもよい。本発明のポリアミド化合物の医薬上許容される塩は、強いまたは中程度に強い、非毒性、有機、または無機の酸または塩基を用いて、当業者に既知の方法により形成される。本発明に包含される塩の例としては、マレイン酸塩、フマル酸塩、乳酸塩、蔞酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、酒石酸塩、クエン酸、塩酸塩、臭酸塩、リン酸塩、および硝酸塩が挙げられる。

【0047】

上記のように、本発明のポリアミド化合物は遺伝子発現または過剰発現を抑制する能力、あらゆる多数の疾患または症状（もっとも顕著には癌、特に乳癌）の治療に利用される性質を有する。本発明の組成物はそれ自体活性であってもよく、またはインビボで活性型に変換される「プロドラッグ」として作用してもよい。

【0048】

本発明の化合物及びその医薬上許容される塩を慣用の投与形態（例、カプセル、含浸ウエハー、錠剤、または注射剤）に取り込んでもよい。固体または液体の医薬上許容される担体を用いてもよい。徐放剤用にデザインされた医薬組成物を製剤してもよい。

【0049】

好適には、本発明の化合物は、全身的に投与される（例、注射によって）。使用時に、注射は任意の既知の経路（好ましくは、静脈内、皮下、筋肉内、頭蓋内または副腔内）による。注射可能物質を慣用の形態（溶液または懸濁液、注射前に液体中に溶液または懸濁液にするのに適した固体、または懸濁液として）に調製してもよい。

【0050】

固体の担体は、デンプン、乳糖、硫酸カルシウム二水和物、白土、スクロース、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アラビアガム、ステアリン酸マグネシウム

ムおよびステアリン酸を包含する。液体の担体は、シロップ、ピーナツ油、オリーブ油、生理食塩水、水、デキストロース、グリセロール等を包含する。同様に、担体または希釈剤は任意の徐放性材料（例、モノステアリン酸グリセリンまたはジステアリン酸グリセリン）を単独で、またはワックスとともに含んでもよい。液体担体を用いる場合、調製物はシロップ、エリクシル、エマルジョン、ソフトゼラチン、カプセル、液体含有カプセル、アンプルまたは水性もしくは非水性の液体懸濁物のような滅菌注射可能液体（例、溶液）の形態であってもよい。このような医薬条の組成物の概要は、たとえば、Remington's、Pharmaceutical Sciences、Mack Publishing Company、Eaton Pennsylvania(Gennaro 第18版、1990年)に記載されている。。

【0051】

医薬製剤は、錠剤形態について必要ならば、混合、造粒および圧縮などの工程、または適当ならば成分の混合、充填および溶解を含む薬化学の慣用技術にしたがって調製され、経口あるいは、局所、経皮、腔内、鼻内、気管支内、頭蓋内、眼内、耳内および直腸投与をはじめとする非経口について所期の製品が得られる。医薬組成物は、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤などの少量の非毒性補助物質も含むことができる。

【0052】

好ましい投与経路は全身投与であるが、医薬組成物は、局所的または経皮（例えば、軟膏、クリームまたはゲル等として）、経口、直腸（例えば、座剤として）、非経口、注射または連続的注入により、腔内、鼻内、気管支内、頭蓋内、耳内、または眼内投与することもできる。

【0053】

局所的投与のために、軟膏のような局所的に適用されるビヒクルに組成物を混合してもよい。活性成分の担体は噴霧可能または非噴霧の形態のいずれであってもよい。非噴霧の形態は、局所的適用に固有の担体を含み、および好適には水よりも極めて大きな粘性率を有する半固体または固体の形態であってもよい。適当な製剤は、溶液、懸濁液、エマルジョン、クリーム、軟膏（ointment）、散剤、リニメント、軟膏（salve）等を含むがこれに限定されるものではない。所望に

より、これらを滅菌し、または補助剤（例、保存剤、安定化剤、湿潤剤、緩衝剤、または浸透圧に影響する塩）と混合してもよい。非噴霧の局所的製剤に好適なビヒクルは、軟膏基剤（例、ポリエチレングリコール-1000（PEG-1000）、HEBクリーム等の慣用のクリーム、ジェル、およびワセリンを含む。

【0054】

化合物が、好適には固体または液体不活性担体物質と組合せて、スクイーズボトルに充填され、または加圧された揮発性物質（通常、ガス状のプロペラント）と混合されて充填されている噴霧可能なエアゾール製剤もまた局所的適用に適している。エアゾール製剤には、本発明の化合物に加えて、溶媒、緩衝剤、界面活性剤、香料、および／または酸化防止剤を含有させることができる。

【0055】

好適な局所的適用（特にヒト用）については、有効量の化合物の標的領域（例、皮膚表面、粘膜、目、等）への適用が好ましい。この量は、処置する領域、症状または疾患の重篤度、および用いる局所的ビヒクルの性質に依存し、通常、適用あたり約0.001mg～約1gである。

【0056】

また、本発明の組成物を、疾病または症状の治療に用いられる1以上のさらなる化合物と組み合わせて投与してもよい。癌治療用には、例えば有糸分裂阻害剤（例、ビンブラスチン）；アルキル化剤（例、シクロホスファミド）；葉酸代謝拮抗剤(folate inhibitor)（例、メトトレキセート、プリトレキシム(pritrexim)またはトリメトトレキセート）、代謝拮抗物質（例、5-フルオロウラシルおよびシトシンアラビノシド）、インターカレーティング(intercalating)抗生剤（例、アドリアマイシンおよびブレオマイシン）、酵素または酵素阻害剤（例、アスパラギナーゼ）、トポイソメラーゼ阻害剤（例、エトポシド）、または生物学的応答変更因子（例、インターフェロン）のような抗腫瘍剤と組み合わせてポリアミドおよび誘導体を与える。要するに、任意の既知の癌治療剤を、本明細書に開示するポリアミンアナログおよび誘導体と組み合わせて含む医薬組成物は本発明の範囲内である。

【0057】

本発明の典型的な1回の投与量は、約1 ng～約10 g/kg体重の間である。投与量は好ましくは約0.01 mg～約1 g/kg体重であり、もっとも好ましくは約0.1 mg～約100 mg/kg体重である。局所投与用には、約0.01～20%濃度の化合物、好ましくは1～5%、の範囲の投与が提示される。経口投与用では、1日の投与の総量は約1～500 mgの範囲内が好ましい。しかし、上記の範囲は示唆的であり、個々の治療レジメに関する変数は多数であるので、これらの推奨される値からの少なからぬ変化は、当業者によって予測され、また慣例的に行われる。

【0058】

疾病または症状を治療するための化合物の有効量または投与量は、特定の疾病または症状用の認められているインビトロシステムまたはインビボ動物モデルを用いて決定できる。癌の場合、当業者が認めている多くのモデルが知られており、ヒト腫瘍の広いスペクトルを表わす。ヒトまたは非ヒト由来の多数の腫瘍細胞ラインのいくつかを用いる標準的なアッセイを用いてカルチャーにおける腫瘍細胞増殖の抑制について試験することができる。動物モデルを包含するこれらのアプローチの多くは、Geran, R.I.ら、“Protocols for Screening Chemical Agents and Natural Products Against Animal Tumors and Other Biological Systems(第3版)”、Canc. Chemother. Reports、第3部、3:1-112に詳細に記載されている。

【0059】

投与モデル

上記のように本発明の治療方法はポリアミド含有組成物の投与を指向する。本発明のポリアミド含有製剤は、全身的または局所的に投与することができ、および単独または混合物の成分として投与できる。投与経路は、局所、静脈内、経口またはインプラントの使用によってもよい。例えば、ポリアミドを、これに限定されるものではないが、局所用製剤、静脈内注射もしくは注入、経口摂取、または腹腔内注入もしくはインプラントの形態での局所投与を包含する手段によって投与してもよい。さらなる投与経路は、慣習的または便利な形態でのポリアミドの皮下、筋肉内、または腹膜内注射である。所望により、リポソームまたは脂肪

親和性の製剤を用いてもよい。局所投与用には、ポリアミドが、ローション、懸濁物またはペーストを包含する標準的な局所用製剤および組成であってもよい。経口の経路を介して、ポリアミドを容易に標的細胞または組織へ投与できる場合、適当な製剤の経口投与も適当でありうる。

【0060】

当業者は、ポリアミドの投与量を、これに限定するものではないが、選択したポリアミド、これが運ばれる物理的デリバリーシステム、個々の患者、熟練した実施者の判断等の要素によって最適化できる。

【0061】

ここでは本発明を一般的に記載したが、下記の実施例を参照して本発明がより容易に理解されるであろう。該実施例は説明のために供されるものであり、特に記載の無い限り、本発明を限定するものではない。

【0062】

実施例1

電気泳動シフトアッセイ

電気泳動シフトアッセイを実施して、HER2/neuプロモーターのTATAボックスの隣接する配列に特異的な様々な濃度のポリアミドの添加がTATA結合タンパク質(TBP)のDNA結合活性に影響するかどうかを確認した。HER2/neuTATAボックスおよび隣接配列に対応するオリゴヌクレオチドを合成した。第1のオリゴヌクレオチド、HERTATA1は、配列：

5'-GCTGCTTGAGGAAGTATAAGAATGAAGTTGTGAAG-3' (TATAボックスを下線で示す) を有する。相補オリゴヌクレオチド、HERTATA2は、配列：

5'-CTTCACAACCTTCATTCTTATACTTCCTCAAGCAGC-3' を有する。これらの35塩基の相補オリゴヌクレオチドを γ -³²P-ATPおよびT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて5'末端標識し、ついでアニーリングして二本鎖35塩基対オリゴヌクレオチドを得た。ついで、このオリゴヌクレオチドを、4mM MgCl₂および0.02% (v/v) NP-40非イオン性界面活性剤を含む5%非変性ポリアクリルアミドゲル(29:1

アクリルアミド対ビスアクリルアミド)と44mMトリス-ホウ酸, pH8.3, 1mM EDTAとを用いる電気泳動シフトアッセイに用いた。10%グリセロール (v/v), 20mM HEPES-OH, pH7.9, 25mM KCl, 0.025% NP-40 (v/v), 100 μ g/ml ウシ血清アルブミン, 0.5mMジチオスレイトール, 0.8mMスペルミジン, 0.1mM EDTA, 2mM MgCl₂を含有する反応容量20 μ l中で、標識オリゴ体を0.1nMの濃度で最終濃度1nMのTBP (Promega)と反応させた。

【0063】

0.1nM~30nMの範囲の様々な濃度の各ポリアミドをこの結合反応に添加した。反応物をポリアクリルアミドゲル電気泳動に荷し、つづいてImage Quantソフトウェアを導入したMolecular Dynamics phosphorimagerを用いて、乾燥させたゲルをイメージ処理および定量した。結果を(図4)に示す。明らかに、HER2/neu-特異的ポリアミド(ポリアミドHER2-1(図4A)、70(図4B、四角)、およびImPyPyPy- γ -PyPyPyPy- β -RPRの組成のRPR70(図4B、 \times)は有意にインビトロのHER2/neuTATAボックスへのTBPの結合を減少させた。HER2/neuに特異的でない対照のポリアミド86(図4B、丸)は、HER2/neuTATAボックスへのTBPの結合にほとんど影響を与えなかった。

【0064】

「RPR」はポリアミドにおける荷電アルギニン-プロリン-アルギニン テールの存在を示す。

【0065】

実施例2

無細胞系におけるインビトロでの転写抑制

制限エンドヌクレアーゼDraIを用いて、HER2/neuプロモーターを有するプラスミドpGEM/HNP (Ebbinghausら、(1993))を線状化し、転写の鋳型を生産した。この鋳型は270塩基対のHER2/neuプロモーターおよび400塩基対の下流配列を含んだ。100ngの鋳型DNAおよび2 μ lのHeLa細胞核抽出物を含む20 μ l反応物中で、供給者 (Promega) の

推奨するように25 μ lの反応容量で転写反応を実施した。これらの反応物を10 μ Ci α - 32 P-GTPの存在下で0.6 mMの非標識ヌクレオシド三リン酸と20 μ M GTPとともに30°C, 1時間インキュベートした。供給者(Teltest)の推奨するようにRNAzolを用いて標識転写産物を精製し、8.3 M尿素および88 mMトリス-ホウ酸、pH 8.3、2 mM EDTAを含む8%ポリアクリルアミドゲルの変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動に荷した。

乾燥させたゲルを、phosphorimager(Molecular Dynamics)を用いて、イメージ処理および定量した。このHER2/neuプロモーター鑄型由来のインビトロ転写物は、ポリアミドHER2-1を増量する添加によって抑制された(図5)。ポリアミド無添加の反応と比較して、10 nM HER2-1の添加は影響を与えなかったが、100 nMの添加は、転写を2倍抑制した。対照として、無関係のサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターを転写鑄型として用いるインビトロ転写も実施した。この鑄型への10 nMまたは100 nMのHER2-1の添加は、転写レベルを有意には減少させなかった。

【0066】

実施例3

細胞培養物におけるHER2/neu発現の抑制

多くの乳癌セルラインをAmerican Type Culture Collectionから入手し、細胞培養物に維持した。これらのセルラインは、HER3/neu遺伝子が増幅されて極めて過剰に発現している乳癌細胞(SK-BR-3およびZR 75-1)、および正常なコピー数のHER2/neu遺伝子を有しHER2/neuを正常な低レベルで発現している乳癌細胞(Hs 578T)を含む。37°C、5% CO₂/空気混合物の条件下での、これらの細胞の増殖期に、様々な濃度のポリアミドを、10% (v/v) ウシ胎児血清を加えた適当な細胞培養培地中に直接添加した。最初の実験のため、ポリアミドHER2-1を様々な濃度で培地に添加した。対照ポリアミド(HIV-1)を様々な濃度で別々の細胞のフラスコに添加した。ポリアミドHIV-1は構造上HER2-1と似ているが、HER2/neu TATAボックスまたはその隣接配列を特異的には認識しない。

【0067】

次の実験では、セルラインSK-BR-3をポリアミドで6日間処理した。この実験では、ポリアミドHER2-1およびポリアミド70を別々の実験で、最終濃度が $0.5 \mu\text{M}$ になるように細胞培養培地に添加した。3日間のインキュベーションの後、新しい培地と新しいポリアミドをこの細胞に添加した。これらの細胞をさらに3日間インキュベートし、ついでRNA抽出のために採取した。

【0068】

細胞が 75 cm^2 の培養フラスコ中でコンフルエントとなるまで増殖した後、付着細胞を2mlの 0.05% トリプシン- 0.53 mM EDTA (Gibco BRL) で処理して細胞を培養フラスコから剥がすことにより、ポリアミド処理乳癌細胞を採取した。これらの細胞を回収して臨床遠心分離機中 5000 rpm (IEC) でペレットにした。細胞を冷 $1 \times$ リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) でリンスし、臨床遠心分離機中でペレットにした。RNAzol (Teltest) を用いて細胞から全RNAを抽出した。充填細胞容積 $100 \mu\text{l}$ に対して、1mlのRNAzolおよび $100 \mu\text{l}$ のクロロホルムを添加した。この混合物を10秒間攪拌し、10分間氷上に静置した。ついで、混合物を 4°C 、 $14,000 \text{ g}$ で15分間、微量遠心分離機にかけた。上層を除去し、全RNAを等量のイソプロパノールで沈降させた。RNAペレットを 70% エタノールで洗浄し、減圧下で乾燥させ、 $50 \sim 100 \mu\text{l}$ の $1 \mu\text{l}$ のRNasin (40ユニット) を含む無RNAアーゼ (DEPC処理) 水に再懸濁した。

【0069】

ついで、相対レベルのHER2/neu mRNAのアッセイとして、ポリアミド添加の影響を逆転写 (RT) -ポリメラーゼチェーンリアクション (PCR) を用いて分析した。HER2/neuプロモーターからの転写量を用いて、これらのHER2/neu mRNAレベルを校正しなければならず、これによってポリアミドHER2-1がインビボの転写に何らかの影響を有するかどうかの決定が可能になる。HER2/neu癌遺伝子に特異的なPCRプライマーを用いると、HER2/neu mRNAの相対レベルを反映して、PCR産物はHER2/neu cDNAに対応する。PCRプライマーは: (Her2A) $5' - \text{GCTGGCCCGATGTATTTGATGGT} - 3'$ および (Her2B

) 5'-GTTCTCTGCCGTAGGTGTCCCTTT-3'であり、各50 ngを下記のようにPCR反応に用いた。

【0070】

逆転写(RT)-ポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)を用いて、種々の細胞に由来するHER2/neu mRNAの相対量を測定できる。上記のようにしてポリアミド処理乳癌細胞から全RNAを抽出した後、各別々の細胞型およびポリアミド濃度について全RNAの濃度を吸光光度計(260 nmでも光学濃度を用いて)によって測定する。各RT-PCRに等量の全RNA(10 ng)を用いる。Reverse Transcription System キット(Promega)を用いてRT-PCRを実施した。推奨されるように、オリゴdTプライマーを用いて、逆転写酵素により、42℃、25分間でmRNA鋳型からcDNAを合成した。ついで、これらのcDNAをPCRの鋳型として用いる。上記キット中の緩衝液およびTaqポリメラーゼを用い、94℃で45秒間の変性、60℃で45秒間のアニーリング、および72℃で2分間の伸長の26サイクルでPCRを実施した。5 μ Ciの放射活性ヌクレオチド α -³²P-dATPをPCR工程中に入れて、放射標識PCR生産物を生産し、これをアクリルアミドゲル上で分析し、オートラジオグラフィーで可視化できる。PCR産物の相対量は、phosphorimager(Molecular Dynamics)を用いて定量できる。ポリアミドで処理していない細胞からのHER2/neu mRNAのレベルは陽性対照であり、これを1.0の値とし、非処理細胞の値に対する相対値を、ポリアミド処理細胞試料についてのHER2/neu mRNAレベルとした。

【0071】

これらのRT-PCRアッセイの結果を図6に示す。ポリアミドHER2-1を用いる1~2日間のセルラインSK-BR-3およびHs 578-Tの処理は、HER2/neu mRNAの相対レベルにおいて2倍弱の減少の結果を与えた。対照ポリアミドHIV-1はHER2/neu mRNAの相対レベルに明確な影響を有さなかった。SK-BR-3細胞をポリアミドHER2-1または70のいずれかで6日間処理した場合、1~2日間処理した細胞に比べてより有意に減少した。SK-BR-3細胞は、アミドHER2-1または70で処理

した場合、HER2/neu mRNAの相対レベルと比較して、各々4倍および3倍の減少を示した。これらの結果は、ポリアミドが細胞に入り、その標的ヌクレオチド配列に結合し、それによってその遺伝子の発現に影響を与えられることを示す。

【0072】

すでに明確に取り込まれているか否かに関わらず、本明細書において記載したすべての文献はその内容を出典明示により本明細書の一部とする。

ここで本発明を完全に開示しているので、本発明の精神および範囲からの逸脱および過度の実験をすることなく、同等のパラメーター、濃度、および条件の広い範囲内で、これを実施できることは当業者に理解されよう。本発明はその特定の具体例に関連して記載されているが、さらなる変更が可能であることは理解されよう。本出願は、一般に本発明の原則に従った、当業界の公知または通例的で、前記および添付の請求の範囲に記載されているような基本的特徴を適用できる本発明からの逸脱を包含する本発明の任意の変更、使用、または適用を網羅する。

【図面の簡単な説明】

【図1】 Her2/neuプロモーターを表す図である。Aは、Est、AP-2およびTBP（「TATA」）転写因子の結合部位および「CCAATボックス」を含むヌクレオチド配列を示す。Bは概略図（一定比率でない）である。

【図2】 図2AはポリアミドHER2-1（左）およびミスマッチポリアミドImPy-β-PyIm-γ-PyPyPyPyPy-β-Dp（右）のDNアーゼIフットプリント滴定の結果を示す図である。図2Bはポリアミド構造の概略図およびポリアミド類の会合定数であり、ポリアミド中のイミダゾール環は黒丸で、ピロール環は白丸で示し、曲線でγアミノブチル酸を示し、ひし形でβアラニンを示し、正荷電を付した半円でジメチルアミノプロピルアミドを示した。

【図3】 図3はHER2/neuプロモーター、ポリアミド構造および結合部位の配列を比較する；TATA結合タンパク質（TBP）に対する結合部位

をポリアミドHER2-A、HER2-1、70およびミスマッチポリアミド86と共に示した。

【図4】 図4はポリアミドHer2-1 (A) および70の、TBP結合における作用についての試験結果をグラフにしたものである。

【図5】 図5はポリアミドHER2-1の、無細胞系におけるインビトロHER2/neu転写に対する作用についての試験結果をグラフにしたものである。

【図6】 図6はポリアミドHER2-1および70の、ヒト乳癌セルラインSK-BR-2におけるHER2/neuのmRNA生成に対する作用についての試験結果をグラフにしたものである。

【図 1 A】

5'-CCCGGGGGTCTGGAAGCCACAAGTAAACACAACACATCCCCCTCCTTGACTATGCAATTTTACTA
 GAGGATGTGGTGGGAAAACCATTATTTGATATTAACAAATAGGCTTGGGATGGAGTAGGATGCAAGCT
 CCCCAGGAAAGTTTAAGATAAACCTGAGACTTAAAAGGGTGTTAAGAGTGGCAGCCTAGGGAATTTATC
 CCGGACTCCGGGGGAGGGGGCAGAGTCACCAGCCTCTGCATTTAGGGATTCTCCGAGGAAAAGTGTGAGA
^{AP-2}
 ACGGCTGCAGGCAACCCAGGCGTCCCGGCGCTAGGAGGGACGACCCAGGCCTGCGCGAAGAGAGGGAGAA
 AGTGAAGCTGGGAGTTGCCGACTCCAGACTTCGTTGGAATGCAGTTGGAGGGGGCGAGCTGGGAGCGCG
^{CCAAT ボックス} ^{Ets TATA}
 CTGCTCCAATCACAGGAGAAGGAGGAGGTGGAGGAGGAGGGCTGCTTGAGGAAGTATAAGAATGAAGT
 TGTGAAGCTGAGATTCCCCTCCATTGGGACCGGAGAAACCAGGGGAGCCCCCGGGCAGCCGCGCGCCCC
^{Δ+1}
 TTCCCACGGGGCCCTTTACTGCGCCGCGCGCCCGGCCCCCACC-3'

HER2/neu プロモーターエレメント

TATA: TBP/TFIID

Ets: ESX, そしておそらく PEA3, ERM

CCAAT ボックス: NF-Y (CP1, CBF, EFlとも呼ばれる)

Fig. 1A

【図 1 B】

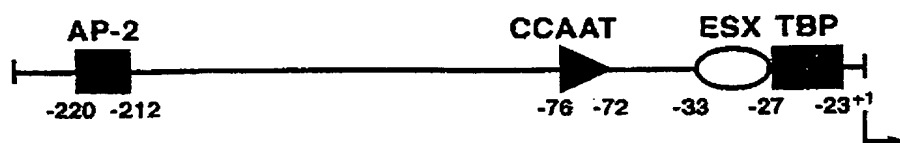


Fig. 1B

【図2A】

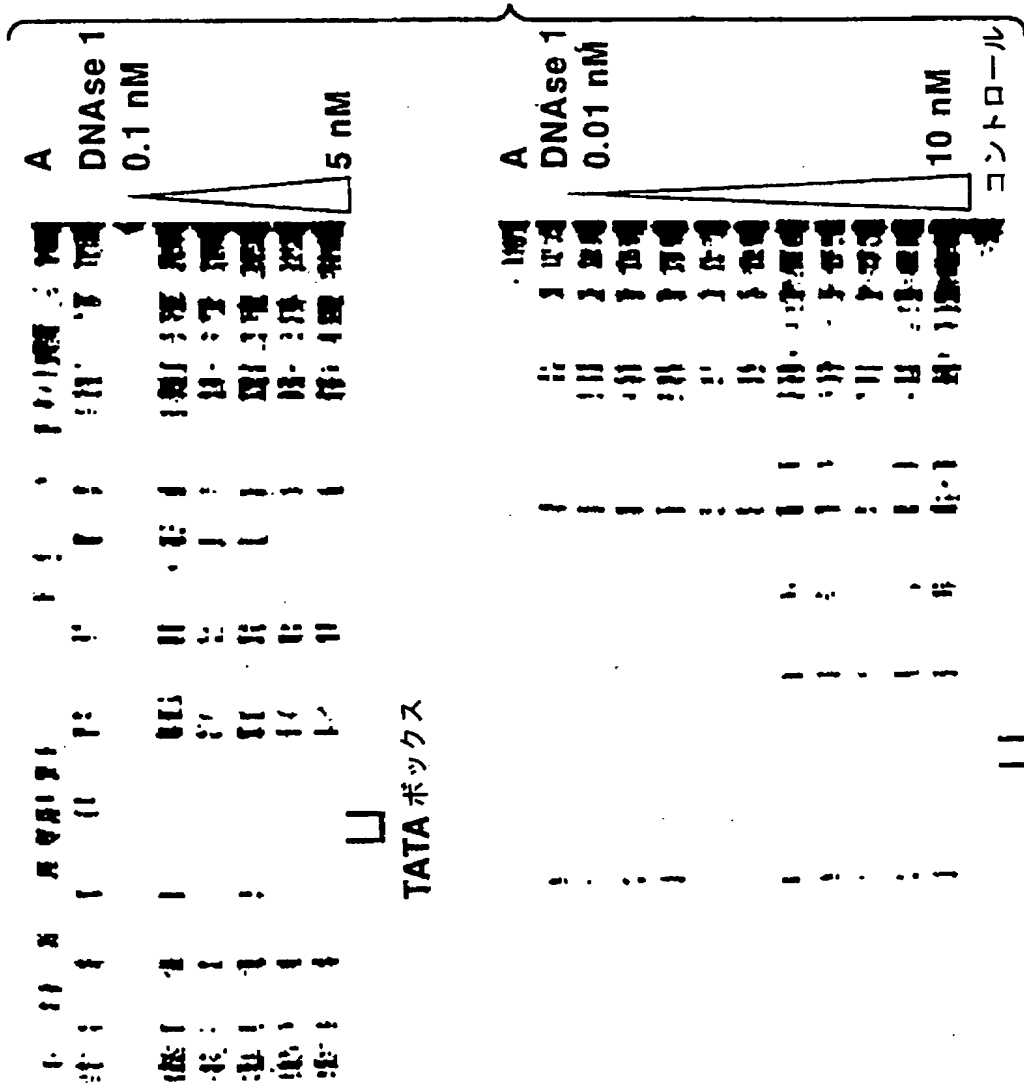


Fig. 2A

【図2B】

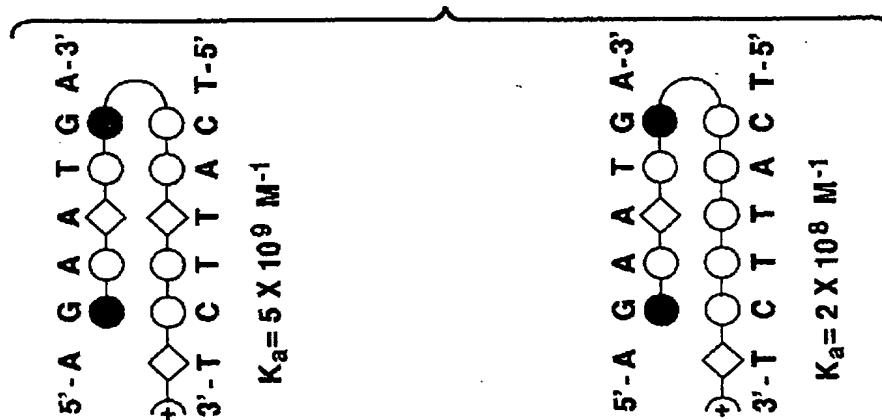


Fig. 2B

【図 3】

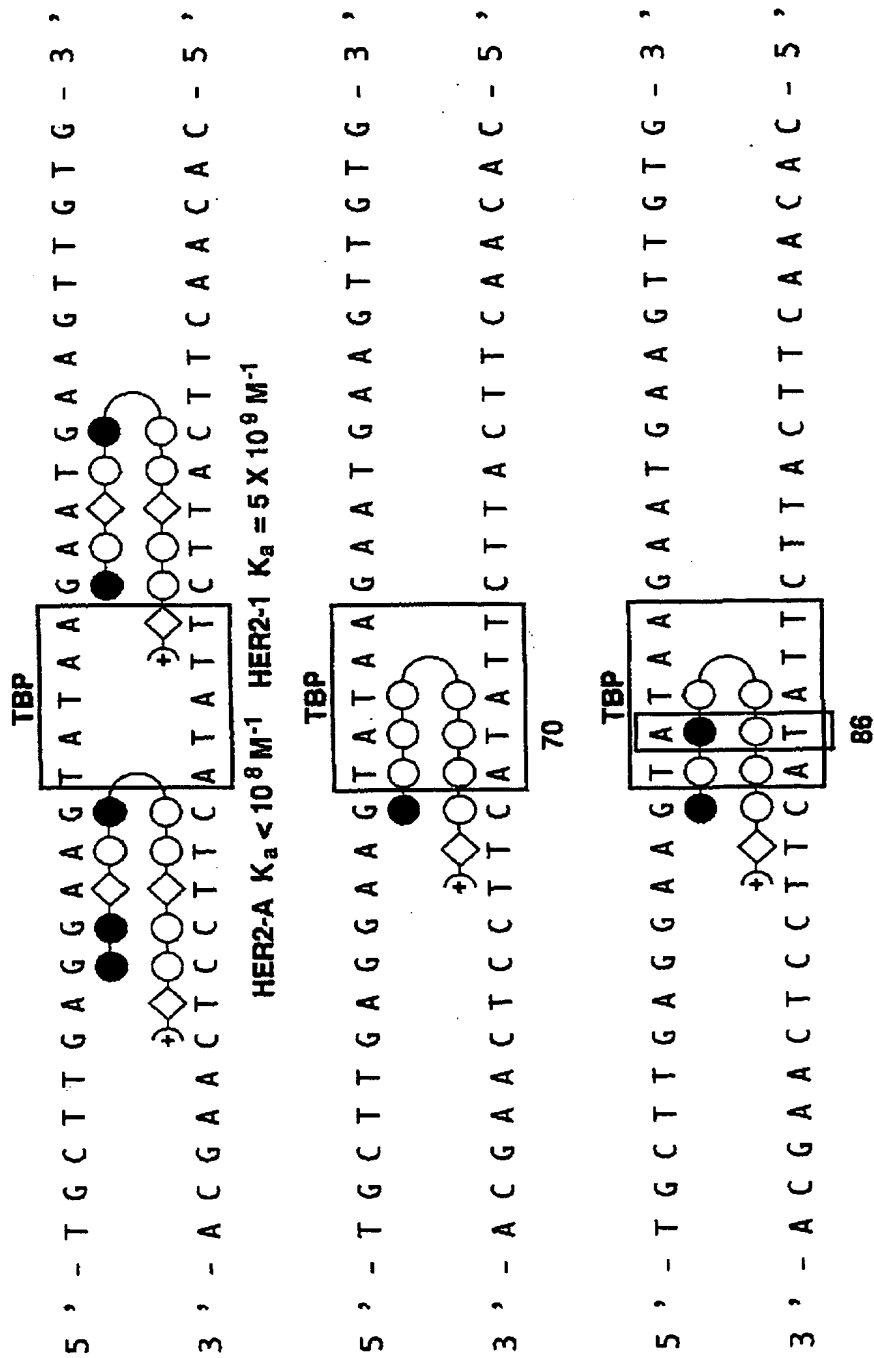


Fig. 3

【図 4】

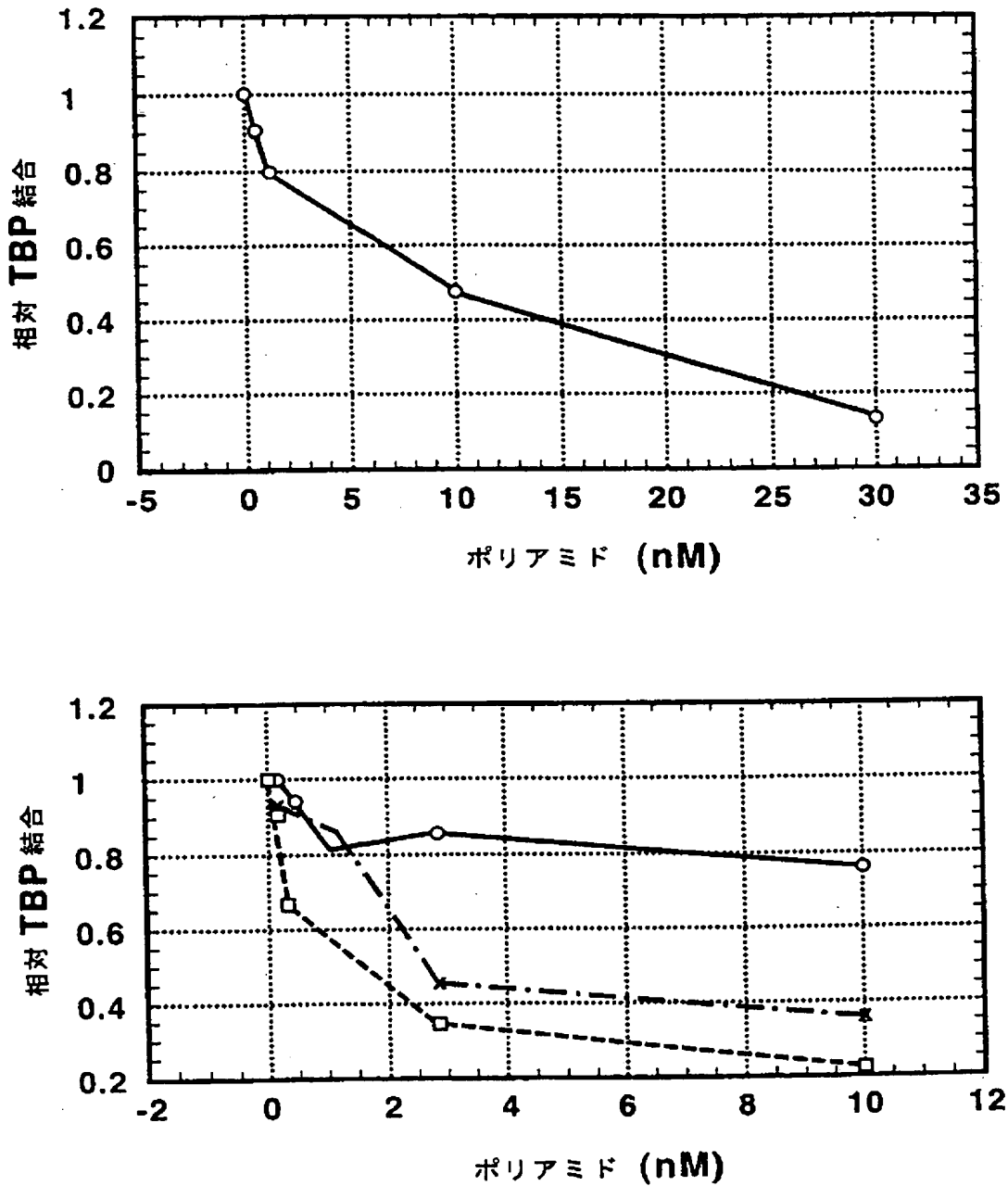


Fig. 4

【図5】

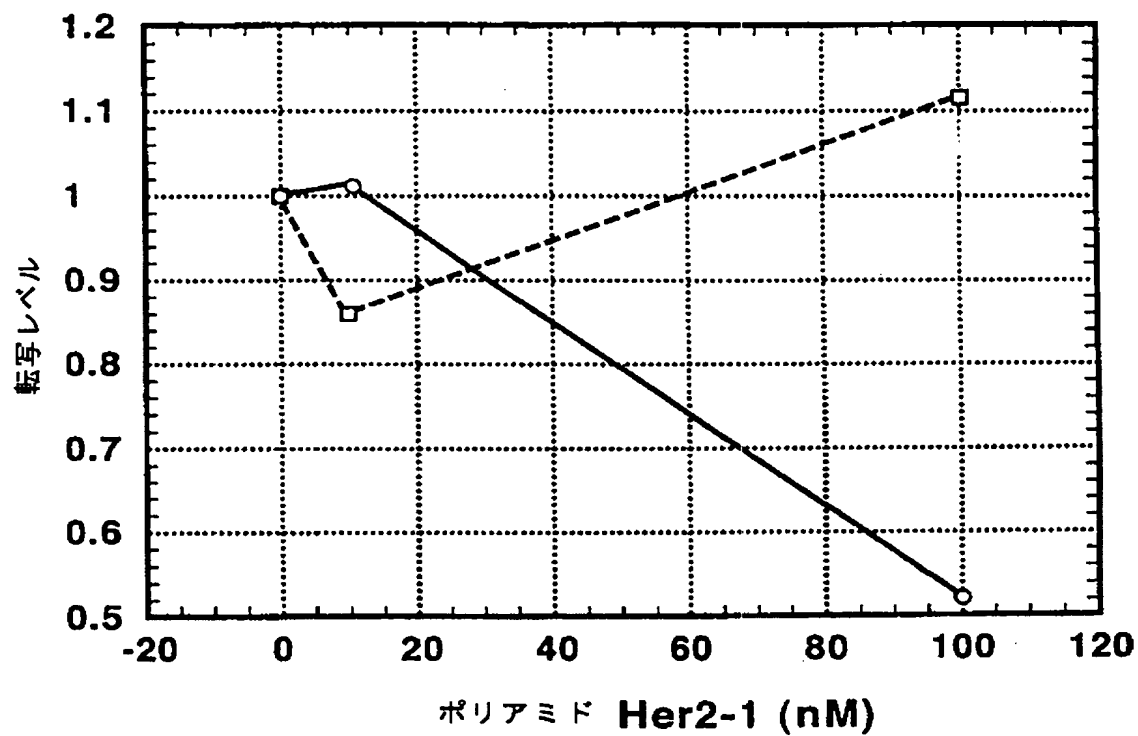


Fig. 5

【図 6】

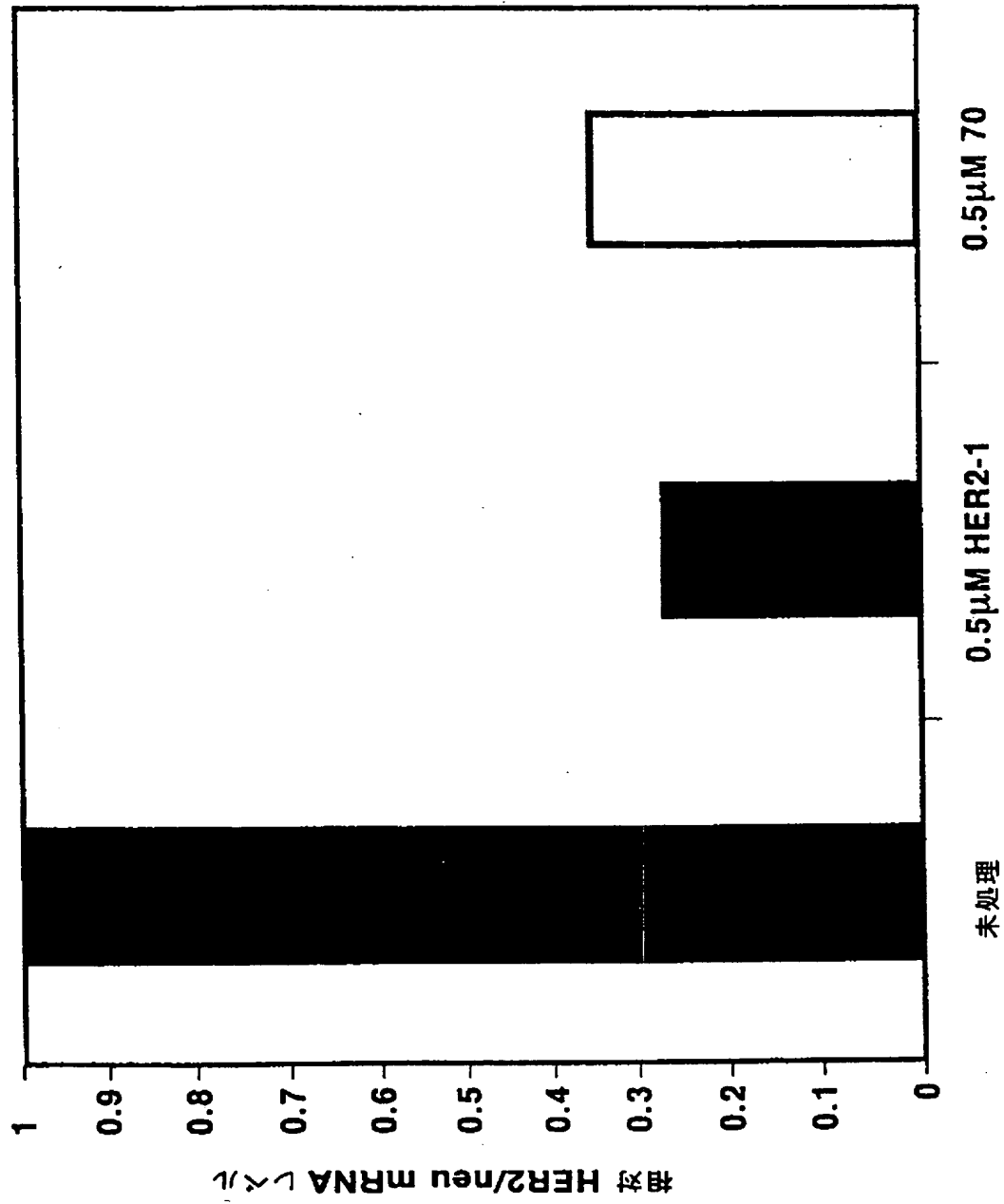


Fig. 6

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US99/20971

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : A61K 38/00, 38/04, 38/08; C12Q 1/68; C12N 5/00, 5/06

US CL : 435/6, 325; 514/34; 530/300, 323, 328, 329, 330; 536/24.3, 24.5

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 435/6, 325; 514/44; 530/300, 323, 328, 329, 330; 536/24.3, 24.5

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
NONE

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

USPATFULL, MEDLINE, CAPLUS, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TRAUGER et al. Recognition of DNA by Designed Ligands at Subnanomolar Concentrations. Nature. 08 August 1996, Vol. 382, pages 559-561, see the entire document.	1-24
A	BENZ et al. HER2/Neu and the Ets Transcription Activator PEA3 Are Coordinately Upregulated in Human Breast Cancer, Oncogene. 1997, Vol. 15, pages 1513-1525, see the entire document.	1-24
A	WADE et al. Design of Peptides That Bind in the Minor Groove of DNA at 5'-(A,T)G(A,T)C(A,T)-3' Sequences by a Dimeric Side-by-Side Motif. J. Am. Chem. Soc. 1992, Vol. 114, pages 8783-8794, see the entire document.	1-24



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier document published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 DECEMBER 1999

Date of mailing of the international search report

21 JAN 2000

Name and mailing address of the ISA/US
Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

F.T. Moore, PhD

Telephone No. (703) 305-4508

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US99/20971

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WHITE et al. Effects of the A*T/T*A Degeneracy of Pyrrole-Imidazole Polyamids Recognition in the Minor Groove of DNA. Biochemistry, 1996, Vol. 35, pages 12532-12537, see the entire document.	1-24
A	WHITE et al. On the Pairing rules for Recognition in the Minor Groove of DNA by Pyrrole-imidazole Polyamides. Chemistry & Biology, 1997, Vol. 4, No. 8, pages 569-578, see the entire document.	1-24
A	CHANG et al. ESX: A Structurally Unique Ets Overexpressed Early During Human Breast Tumorigenesis. Oncogene, 1997, Vol. 14, pages 1617-1622, see the entire document.	1-24
A	BAERT et al. Expression of the PEA3 Group of ETS-related Transcription Factors in Human Breast-Cancer Cells. Int. J. Cancer, 1997, Vol. 70, pages 590-597, see the entire document.	1-24
A	BOSHER et al. The Developmentally Regulated Transcription Factor AP-2 Is Involved in c-erbB-2 overexpression in Human Mammary Carcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, January 1995, Vol. 92, pages 744-747, see the entire document.	1-24
A	MARKISCH et al. Antiparallel Side-by-Side Dimeric Motif for Sequence-Specific Recognition in the Minor Groove of DNA by the Designed Peptide 1-Methylimidazole-2-Carboxamide Netropsin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, August 1992, Vol. 89, pages 7586-7590, see the entire document.	1-24

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
G 0 1 N 33/50		C 1 2 Q 1/68	A
33/566		A 6 1 K 37/02	
// C 1 2 Q 1/68		C 1 2 N 15/00	Z N A A

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ビーター・ビー・ダーバン
 アメリカ合衆国91125カリフォルニア州パ
 サディナ、メール・ステーション16-30、
 イースト・カリフォルニア・ブールバード
 1200番、カリフォルニア・インスティテュ
 ート・オブ・テクノロジー

Fターム(参考) 2G045 AA40 DA36 DA78 FB02
 4B024 AA11 BA63 CA04 DA02 EA04
 GA11 HA14
 4B063 QA01 QA13 QA18 QQ02 QQ53
 QR08 QR55 QR62 QS25 QS34
 4C084 AA02 BA02 BA10 BA23 BA32
 CA59 ZB26 ZC41